

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-188600

(43)Date of publication of application : 24.07.1990

(51)Int.Cl.

C07K 7/10  
A61K 37/02  
A61K 37/02  
A61K 37/02  
C07K 7/08  
// C07K 99:00

(21)Application number : 01-007944

(71)Applicant : CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 17.01.1989

(72)Inventor : KOISHIHARA YASUO  
MURAYAMA EIGOROU  
FUKUI HIROYASU

(54) BSF2 ANTAGONIST

(57)Abstract:

**NEW MATERIAL:** A polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2 expressed by the formula, etc., and having antagonism action to the human B cell stimulation factor 2.

**USE:** A remedy and diagnostic for atrial myxoma, carcinoma of uterine cervix, endotoxin, shock, myeloma, chronic rheumatism, etc.

**PREPARATION:** For example, a method for successively bonding amino acids whose  $\alpha$ -amino groups are protected according to normal Merrifield solid method by BOC method so as to synthesize a peptide chain is used and proceeding of coupling of the protected amino acid is carried out using Kaiser test while monitoring to provide the polypeptide in which plurality of amino acids are lost from N ends and/or C ends of human B cell stimulation factor 2.

PRO PAL PRO PRO DALY GLY ASP SER LYS ASP VAL  
ALA GLN PRO SER ARG CYS PRO PRO ARG SER SER  
GLY ARG VAL ASP LYS GLN SER ARG TYR ILE LEU  
ASP VAL LYS SER ALA LEU ARG LYS GLY TYR CYS  
ARG LYS CYS ASP MET CYS CYS SER SER LYS GLY  
ALA CYS GLY SER SER ARG CYS LEU ARG LYS PRO LYS  
MET ALA CYS LYS ASP GLY CYS PRO SER MET CYS  
PRO ARG CYS GLY TYR CYS SER VAL LYS ILE LYS  
TYR CYS LYS ARG GLY PRO CYS VAL TYR ARG CYS  
TYR CYS GLY ARG ARG PRO CYS SER SER GLY GLY  
GLY ALA ARG ALA TYR CYS MET SER TYR SER VAL  
LYS LYS CYS ARG ARG CYS GLY LYS LYS ALA ARG ARG  
LEU ASP ALA LYS TYR TYR ARG ARG PRO TYR TYR  
SER ALA SER LYS CYS ILE LYS LYS LYS GLY ALA CYS  
ARG CYS TYR LYS CYS ASP MET TYR TYR TYR LYS  
LYS LYS ARG SER PRO LYS CYS PRO LYS GLY SER  
SER SER ARG ALA LEU ARG CYS MET.

⑫ 公開特許公報(A) 平2-188600

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)7月24日

C 07 K 7/10  
A 61 K 37/02

ZNA  
ABG  
ABN  
ADU

8318-4H  
8615-4C  
8615-4C

C 07 K 7/08  
// C 07 K 89:00

8318-4H

審査請求 未請求 請求項の枚 15 (全6頁)

⑮ 発明の名称 B S F<sub>2</sub>アンタゴニスト

⑯ 特 題 平1-7044

⑰ 出 題 平1(1989)1月17日

⑱ 発 明 者 小 石 原 保 夫

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

⑲ 発 明 者 村 山 肇 五 郎

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

⑲ 発 明 者 福 井 博 孝

静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

⑳ 出 願 人 中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

㉑ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三

外4名

明 細 書

1. [発明の名称]

B S F<sub>2</sub>アンタゴニスト

2. [特許請求の範囲]

1. ヒトB細胞刺激因子2のN末端および／またはC末端より複数個のアミノ酸が欠損し、かつヒトB細胞刺激因子2に対し拮抗作用を有するポリペプチド。

2. ポリペプチドがヒトB細胞刺激因子2のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

3. ポリペプチドのアミノ酸数が20個以上である請求項2記載のポリペプチド。

4. ポリペプチドのアミノ酸数が20乃至40個の範囲である請求項3記載のポリペプチド。

5. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列のN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである請求項1記載のポリペプチド。

PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL  
ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER  
GLY ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU  
ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU VAL TYR LEU GLU  
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP ALA ILE THR THR PRO ASP PRO THR THR  
ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN  
ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU  
ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER  
SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET.

6. ポリペプチドが下記のアミノ酸配列の全部、または一部を連続して含むものである請求項1乃至請求項5のいずれかに記載のポリペプチド。

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
7. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

SER<sup>1</sup>ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN

8. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

9. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

10. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP

11. ポリペプチドが該ポリペプチドの構造中の1個または複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えた構造を有するものである請求項1乃至請求項14のいずれかに記載のポリペプチド。

3. [発明の詳細な説明]

<産業上の利用分野>

本発明はヒトB細胞増殖因子2(以下「BSP」と称す)に抗体作用を有するポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドは医薬として有用である。

<従来の技術・発明が解決しようとする課題>

ヒトBSPはB細胞の抗体産生細胞への分化を誘導する因子として研究されている。近年になってBSPをコードするcDNAが単離され、DNA配列に関する情報および構築されたESFの部分内アミノ酸配列等より、BSPは28

MET CYS GLU SER SER LYS GLU

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

11. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP

12. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

13. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PHE GLU

14. 下記のアミノ酸配列で示されるポリペプチド。

アミノ酸残基のシグナルペプチドを有する184アミノ酸残基(下記アミノ酸配列(1)で示される)から構成されていることが明らかになった。

アミノ酸配列式(1):

PRO VAL PRO PRO GLY GLU ASP SER LYS ASP VAL  
ALA ALA PRO HIS ARG GLN PRO LEU THR SER SER  
GLU ARG ILE ASP LYS GLN ILE ARG TYR ILE LEU  
ASP GLY ILE SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS  
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU  
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS  
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER VAL  
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLN PHE GLU VAL TYR LEU GLU  
TYR LEU GLN ASN ARG PHE GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PHE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASN  
LEU ASP ALA ILE THR THR PRO ASP PRO THR THR  
ASN ALA SER LEU LEU THR LYS LEU GLN ALA GLN  
ASN GLN TRP LEU GLN ASP MET THR THR HIS LEU  
ILE LEU ARG SER PHE LYS GLU PHE LEU GLN SER  
SER LEU ARG ALA LEU ARG GLN MET.

最近の知見を総合すると、BSPはB細胞に粒状産生を誘導し、ハイブリドーマ、プラズマサイトーマ、ミエローマ等を増殖させ、HLA (human leukocyte antigen) クラスⅡ抗原の発現を誘導し、血液幹細胞にコロニーを誘導し、肝臓細胞に急性期蛋白質を誘導し、神経細胞に突起を誘導すると考えられる。この様にBSPは種々の異なる生理活性を有し、広く細胞の増殖に関与していると考えられている。

一方、BSPの異常産生が心房内粘液腫、子宮けい癌、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨髄腫)、慢性関節リウマチ、キャスルマン症候群等の疾患における免疫異常の病因因子である可能性が報告されている(平野ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 228頁, 1987年)。従ってBSPの拮抗剤はこれらの疾患の治療薬または診断薬として期待される。しかしながらBSPの拮抗物質に関する報告はこれまで皆無である。

本発明者等はBSPの分子構造、とりわけBSPが細胞膜上に存在するBSP、レセプター

と結合する部分の構造を研究する過程において、BSPのN末端およびC末端より複数個のアミノ酸が欠損したポリペプチドがBSPに対し拮抗作用を有することを見出した。BSPの一部を構成するポリペプチドがBSPに対し拮抗的に作用することは従来全く知られていない所知である。本発明はこの知見に基づき更に検討を加えて完成したもので、BSPに対し拮抗作用を有するポリペプチドに関するものである。このようなポリペプチドはBSPが主因となっている疾患、例えば慢性関節リウマチ、ミエローマ(骨髄腫)、あるいはエンドトキシン・ショック治療薬として有望である。

＜課題を解決するための手段＞

本発明のBSPに拮抗するポリペプチドは、前記式(I)で示すBSP、アミノ酸配列式のN末端および/またはC末端より複数個のアミノ酸が欠損したものである。このポリペプチドはアミノ酸数が20〜40個よりなるものであるが、特にこのアミノ酸数に限定されるものではない。本発明

アミノ酸配列(V):

```

MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

```

アミノ酸配列(W):

```

MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

```

アミノ酸配列(W):

```

GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP

```

アミノ酸配列(W):

```

ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE GLN SER GLY
PHE ASN GLU GLU THR CYS LEU

```

また本発明は、これらの他に例えば以下に示す(II)および(X)といったポリペプチドをも包含する。これらは前記アミノ酸配列(II)の部分構造を

のポリペプチドはBSP、アミノ酸配列から見た場合、概ね2つの群に大別される。一つの群は下記のアミノ酸配列式(II)(この部分は前記アミノ酸配列式(I)で示されるポリペプチドのN末端から数えて5〜6番目のアミノ酸配列に相当する)

アミノ酸配列式(II):

```

ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS

```

で示されるポリペプチドの全部、又は一部を適宜して含むものであり、具体的には、例えば以下の(Ⅱ)〜(Ⅴ)に示すアミノ酸配列、で示されるポリペプチドである。

アミノ酸配列(Ⅱ):

```

SER ALA LEU ARG LYS GLU THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN

```

アミノ酸配列(Ⅲ):

```

THR CYS
ASN LYS SER ASN MET CYS GLU SER SER LYS GLU
ALA LEU ALA GLU ASN ASN LEU ASN LEU PRO LYS
MET ALA GLU LYS ASP GLY CYS PHE

```

有していないポリペプチドである。

アミノ酸(Ⅱ):

PRE ASN GLU GLU THR CYS LEU VAL LYS ILE ILE  
THR GLY LEU LEU GLU PRE GLU

アミノ酸配列(X):

GLU SER SER GLU GLU  
GLN ALA ARG ALA VAL GLN MET SER THR LYS VAL  
LEU ILE GLN PRE LEU GLN LYS LYS ALA LYS ASP  
LEU ASP

なお、本発明は、これらのポリペプチドに限定されるものではない。つまりある特定のポリペプチドの一種もしくは複数個のアミノ酸が他のアミノ酸に置き換えられた場合、またはこれらのアミノ酸が欠損した場合においても、ほぼ同等かそれ以上の活性を示すことはよく知られているところである。本発明においても同様に、前述したアミノ酸配列(Ⅱ)~(X)に示すポリペプチドまたはアミノ酸配列(Ⅰ)で示されるB S F<sub>2</sub>の一部を構成するポリペプチドの一種もしくは複数個のアミノ酸を他のアミノ酸に置き換えたもの、または欠損

したものであっても本質的にB S F<sub>2</sub>の部分構造を含有し、かつB S F<sub>2</sub>に同じ結核作用を有するポリペプチドは本発明に係るポリペプチドである。

本発明のポリペプチドは、その構成アミノ酸数が20~40個程度であり、特に短鎖ペプチド技術を用いることなく、化学合成することができる。ペプチド合成は通常のMerrifield固相法(J. Med. Chem., 1979, 22, 588~589)に従ってB O C法により行った。カップリングの進行はKaiser試験(Anal. Biochem., 1970, 34, 585~588)を用いてモニターした。

以下本発明において製造した前記(Ⅱ)~(X)のアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸分析の結果およびH P L C(高速逆流クロマトグラフィ)分析の結果を表1に示す。なお、アミノ酸分析は本発明のポリペプチドを6 N H C Iで120℃、1.5時間加水分解した後アミノ酸分析機M L C-203システム3(A T T O 社製)を用いる常法に従って実施したものであり、H P L C分析はY M C-R & D (5 micron)(日本分光社製)カラ

ムを用いて0.1% T P A存在下、アセトニトリルを0%~70%のリニアグラジエント(linear gradient)を2.5分間で展開し(flow rate=1 ml/min)、2.60nmの紫外線吸収によりモニターした結果である。

表 1

アミノ酸 No.	(Ⅲ)	(Ⅳ)	(Ⅴ)	(Ⅵ)	(Ⅶ)	(Ⅷ)	(Ⅷ)	(Ⅸ)
ASP	3.8(4)	8.0(8)	4.0(4)	5.9(5)	4.0(4)	5.0(5)	1.2(1)	2.0(2)
GLU	4.2(4)	4.0(4)	4.0(4)	6.7(7)	3.7(4)	4.0(4)	3.7(4)	6.8(7)
SER	4.0(4)	2.7(8)	1.8(2)	2.6(3)	1.7(2)	1.2(1)		3.0(3)
GLY		1.2(1)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	2.3(2)	1.1(1)	
ARG	1.0(1)							1.0(1)
THR	0.9(1)	0.8(1)		1.0(1)		1.0(1)	2.0(2)	1.0(1)
ALA	3.2(8)	3.0(8)	3.0(8)	2.8(8)	3.2(8)	1.1(1)		2.8(8)
PRO		1.1(1)	1.0(1)	1.1(1)	1.1(1)	1.0(1)		
VAL							1.1(1)	2.1(2)
MEZ	1.1(1)	2.0(2)	1.8(2)	1.7(2)	1.0(1)	0.9(1)		1.1(1)
CYS	* (2)	* (2)	* (2)	* (3)		* (2)	* (1)	
ILE							1.4(2)	1.0(1)
LEU	2.1(2)	3.3(3)	3.0(3)	4.0(4)	3.0(3)	3.0(3)	3.1(3)	3.0(3)
PRE		1.3(1)	0.9(1)	1.7(2)		2.3(2)	2.1(2)	1.1(1)
LYS	2.8(2)	4.3(4)	2.8(3)	3.1(3)	2.8(3)	2.1(2)	1.0(1)	4.0(4)
Retention Time(min)	24.25	17.08	15.27	17.99	15.65	29.04	27.39	10.77

表中のポリペプチドのNo. は前述の各アミノ酸配列のNo. に対応している。( )内は推定されるアミノ酸数である。また \* 印はカウントされないものである。

次に本発明のポリペプチドのBSF<sub>2</sub>に対する拮抗作用を示す。拮抗作用は; 96穴のマイトプレートに各ウェルに1×10<sup>4</sup>個のSKW6 CL-4 (CL-4)細胞あるいはCESS細胞を加え、適当量のBSF<sub>2</sub>と共に5日間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養する。培養上清を集め、上清に含まれる抗体 (CL-4はIgM抗体を、CESSはIgM抗体を産生する)量をELISA法により定量する。本発明のポリペプチドのBSF<sub>2</sub>に対する拮抗作用を調べる目的には本発明のポリペプチドを最終濃度10<sup>-4</sup>~10<sup>-7</sup>Mの濃度範囲になるように適宜希釈し、BSF<sub>2</sub>を加える30分前に加えて細胞と予め反応させる。本発明のポリペプチドの添加による抗体産生阻害率は次式により算出した。

$$\text{阻害率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{本発明のポリペプチド添加時の抗体量}}{\text{本発明のポリペプチド非添加時の抗体量}} \right) \times 100$$

その結果を次の表2に示す。なお表中の本発明のポリペプチドのNo. は前記表1表におけるポリペプチドに対応している。

表 2


ポリペプチド No.	阻害率 (10 <sup>-4</sup> M)	
	CL-4	CESS
(Ⅲ)	48% (11)	89% (08)
(Ⅳ)		42% (09)
(Ⅴ)	37% (12)	33% (11)
(Ⅵ)	42% (12)	59% (08)
(Ⅶ)	43% (10)	86% (13)
(Ⅷ)	47% (11)	81% (11)
(Ⅸ)	43% (10)	48% (07)
(X)	76% (07)	87% (07)

表2に示すように本発明ポリペプチドはBSF<sub>2</sub>より誘導されるCL-4あるいはCESS細胞の抗体産生に対し阻害作用を有している。

<発明の効果>

本発明に係る種々のポリペプチドは、BSEに対して増感剤として作用する。従って、これらのポリペプチドは、BSEの発生によって引き起こされると考えられている心臓内熱性腫瘍、子宮けい癌、エンドトキシン・ショック、ミエローマ(骨髄腫)、慢性関節リウマチ、キャスルマン症候群等の免疫異常疾患に対する治療薬あるいは診断薬として利用することが期待されることから、本発明はこの種の免疫異常疾患に対する新たな治療薬及び診断薬への道を開くものとして医薬産業上きわめて有用である。

特許出願人 中外製薬株式会社

代理人 弁護士 湯 田 豊   
(外4名)